Die Identifizierung und Charakterisierung eines Falkenpocken- und eines Psittacidenpockenvirus unter Verwendung von Zellkulturmethoden

Salah Mousa

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547009_0040

Aus der Medizinischen Tierklinik
Lehrstuhl für Krankheiten des Haus- und
Wildgeflügels, der Zier- und Zoovögel
des Fachbereichs Tiermedizin der
Universität München
Vostand: Prof.Dr. I. Gylstorff

Die Identifizierung und Charakterisierung eines Falkenpocken- und eines Psittacidenpockenvirus unter Verwendung von Zellkulturmethoden

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Salah Mousa
aus Ägypten

München 1979

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. I. Gylstorff
1. Korreferent:	Prof. Dr. P.A. Bachmann
2. Korreferent:	Prof. Dr. Dr.h.c. J. Boch

Tag der Promotion: 27. Juli 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern und meiner Frau gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	I
II.	Literatur	1
II.	Material und Methoden	10
IV.	Ergebnisse	19
V.	Diskussion	27
VI.	Zusammenfassung	34
VII.	Literaturverzeichnis	36
VIII.	Abbildungen	46

EINLEITUNG

Das Vorkommen von Pockenviren ist bei über 60 Vogelspezies beschrieben. Als Erreger mit unterschiedlichen Eigenschaften und unterschiedlichem Wirtsspektrum sind bis heute 6 Geflügelpockenviren identifiziert worden: nämlich das Hühner-, Puten-, Tauben-, Kanarien-, Wachtel- und Agapornidenpockenvirus. Außerdem wurden nach Infektionen mit Vacciniavirus schwere Pockenerkrankungen bei Küken und Jungputen beobachtet. In letzter Zeit wurden am Lehrstuhl für Krankheiten des Haus- und Wildgeflügels der Ludwig-Maximilians-Universität Pockenerkrankungen bei Wild- und importierten Ziervögeln festgestellt, über deren Erreger wenig bekannt ist. Im Hinblick auf eine etwaige von diesen Tieren ausgehende Gefahr für das Wirtschaftsgeflügel und auf die Möglichkeit von Schutzimpfungen gegen diese Infektionen bei Zier- und Zoovögeln ist eine weitere Charakterisierung der Erreger notwendig. Das gehäufte Auftreten von Pockenviren bei Großsittichen und Amazonen einerseits sowie andererseits bei Falken und Bussarden warf besonders die Frage nach Zugehörigkeit bzw. Eigenständigkeit dieser Viren auf.
Mir wurde daher die Aufgabe gestellt, je 1 Isolat aus einem Rotflügelsittich und zum anderen aus einem Falken näher zu charakterisieren.
In Anbetracht der Tatsache, daß der früher zur Identifizierung von Pockenviren übliche Tierversuch aufgrund ethischer, finanzieller und technischer Gründe immer mehr verdrängt

wird, sollte hier die Charakterisierung ausschließlich anhand von Zellkulturmethoden durchgeführt werden.

LITERATUR

A. Pockenerkrankungen bei Greifvögeln:

Angaben über Pocken bei Greifvögeln liegen von GERDESSEN (1956), RAETHEL (1962), TROMMER (1964), COOPER (1969), HALLIWELL (1972), MOFFATT (1972), GREENWOOD und BLACKMORE (1973) und PEARSON et al(1975) vor.
Die Krankheit wurde von diesen Autoren hauptsächlich anhand der charakteristischen Pockenläsionen in der Haut festgestellt.
Häufig wurde die Diagnose durch den histologischen Nachweis von Bollinger'schen Einschlüssen abgesichert (RAETHEL, 1962), (TROMMER, 1964) und (HALLIWELL, 1972), oder es wurden Pockenviren direkt in Organmaterial elektronenmikroskopisch nachgewiesen (COOPER, 1969 und PEARSON et al., 1975), Virusisolierungen wurden in der Mehrzahl der Fälle nicht durchgeführt oder sie verliefen ohne Erfolg (KIRMSE, 1967 und 1969).

B. Pockenerkrankungen bei Psittaciden:

SHARMA et al, (1968) berichteten über die Isolierung eines Pockenvirus bei Wellensittichen, das dem Kanarienpockenvirus nahezustehen scheint. KRAFT und TEUFEL (1971) gelang es, ein Pockenvirus aus Zwergpapageien zu isolieren und die Krankheit durch künstliche Infektion von Zwergpapageien zu reproduzieren. Das Isolat ließ sich keinem der

bekannten Geflügelpockenstämme eindeutig zuordnen und wurde als Avipox-agapornis bezeichnet. GRAHAM (1978) konnte in Amazonen mit schweren Veränderungen am Atmungstrakt mittels histologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungsmethoden ein Pockenvirus nachweisen.

Differenzierung von Geflügelpockenviren mittels Zellkultur:

Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten eignen sich gut für die Züchtung von Geflügelpockenviren. Es treten sichtbare Veränderungen auf, die mit Abkugelung und Degeneration beginnen und später in cytolytische Prozesse übergehen (MAYR und KALCHER, 1960).

Die Virusvermehrung, der Ablauf und die Art des cytopathischen Effektes sind bei den einzelnen aviären Pockenviren unterschiedlich und ermöglichen dadurch eine Differenzierung (BANG et al.,1951; KÖHLER und SCHWÖBEL,1956; DOYLE et al.,1963; MAYR,1963; BAMBERGER und MARKOVITS,1965; GELENCZEI und LASHER,1968 und TRIPATHY et al.,1973).

Bei den Hühner- und Putenpockenviren bildet sich die Abkugelungsphase am deutlichsten aus. Sie beginnt bei hohen Inokulationsdosen am 2. Tag und ist zwischen dem 4. und 5. Tag vollständig ausgebildet. Die lytischen Prozesse laufen sehr langsam ab. Häufig dauert es 7 Tage bis die Kulturen zerstört sind. Bei niedriger Inokulationsdosis erfolgt keine Ausbreitung über den ganzen Zellrasen sondern es bilden sich lokalisierte Herde (KÖHLER und SCHWÖBEL,1956; MAYR und KALCHER,1960; DOYLE et al.,1963; BAMBERGER und MARKOVITS,1965; GELENCZEI und LASHER,1968 und MAYR und MAHNEL,1970).

Beim Taubenpockenvirus tritt der cytopathische Effekt,

der ebenfalls als eine Abkugelung mit anschließender Lysis abläuft am spätesten auf. Bei hohen Inokulationsdosen dauert es 3-4 Tage bis erste Abkugelungen erscheinen. Die abgekugelten Zellen bleiben mehrere Tage lang erhalten. Der darauffolgende lytische Prozeß läuft aber dann sehr rasch ab und führt zur vollständigen Auflösung der degenerierten Zellbezirke (MAYR und KALCHER, 1960 und MAYR, 1963).

Beim Kanarienpockenvirus verläuft der Zellzerfall im Vergleich zu den anderen Geflügelpockenviren schneller und stärker. Hohe Inokulationsdosen zerstören i.d.R. nach 2-3 Tagen die Kultur. Die Abkugelungen sind weniger deutlich ausgeprägt, sie erscheinen kleiner, sind stärker granuliert und zerfallen schneller. Nach dem Zerfall der degenerierten Zellen bleibt ein körniger, sandartiger Zelldetritus zurück. Charakteristisch ist, daß auch nach Inokulation von niedrigen Virusdosen die Kultur völlig zerstört wird (MAYR, 1963).

Das Agapornidenpockenvirus ist durch eine rasche Vermehrung in der Zellkultur charakterisiert. Die Veränderungen treten früh auf. In weniger dichten Zellen zeigen sich herdförmige Bezirke abgekugelter Zellen, die sich deutlich von den unveränderten Nachbarzellen abgrenzen. Erste lytische Herdchen lassen sich 40 Stunden p.i. erkennen. Am 3. Tag p.i. sind etwa 90% der Zellen abgekugelt und etwa 40% zerstört (KRAFT, 1971). Bei Züchtung des Wachtelpockenvirus konnte kein cytopathischer Effekt beobachtet werden. Es kam nur zu einer geringgradigen Virusvermehrung

ohne sichtbare Zellveränderung (RINALDI et al., 1972).

Die Kinetik der Virusvermehrung:

Bei dem Hühnerpockenvirus beträgt die Dauer der Eklipsephase 24-36 Stunden. Die Phase der exponentiellen Vermehrung liegt zwischen der 36.-72. Stunde p.i., das Maximum zwischen der 72.-96. Stunde, und ab 120 Stunden p.i. ist ein Titerabfall des zellgebundenen Virus zu beobachten.(GAFFORD et al., 1969 und CHANG et al., 1970). Im Vergleich zu Angaben über das Hühnerpockenvirus war der Vermehrungszyklus beim Agapornidenpockenvirus um durchschnittlich 12-18 Stunden verkürzt (KRAFT, 1971).

Plaque-Technik:

Die Plaque-Technik wurde von MAYR und KALCHER (1962) für die Geflügelpockenviren modifiziert. Die Pockenviren bilden in Form und Aussehen unterschiedliche Plaques, und dadurch stellt diese Methode eine wertvolle Hilfe für die Differenzierung der einzelnen Virusarten der Avipox dar (PORTERFIELD und ALLISON, 1960 und MORITA, 1973). Die Hühnerpocken-Plaques bestehen aus einem aufgehellten Zentrum, das von einer weniger hellen peripheren Zone umgeben ist. Die Größe der Plaques schwankt sehr stark zwischen kleinen, etwa 2 mm breiten und extrem großen Plaques mit einem Durchmesser bis zu 9 mm. Bei letzteren ist ein ca. 4 mm breiter Innenplaque zu unterscheiden (MAYR und KALCHER, 1960 und MAYR, 1963).

Taubenpockenplaques sind immer wesentlich kleiner als Hühnerpockenplaques. Ihr Durchmesser variiert zwischen 1-3 mm. Sie sind charakterisiert durch ein fast durchsichtiges, vollkommen lytisches Zentrum, das bei allen anderen Geflügelpockenplaques fehlt. Es ist scharf konturiert und von mehreren Ringzonen unterschiedlicher Färbung umgeben (MAYR und KALCHER, 1960 und MAYR, 1963).
Die Kanarienpockenplaques besitzen ein vakuolisiertes oder wabenförmig aufgelockertes, mehr oder weniger helles Zentrum, das für sie typisch ist. In dem Innenplaque sind mehrere Ringzonen unterschiedlicher Färbbarkeit und Konsistenz angeordnet (MAYR,1963).
Putenpockenplaques ähneln denen der Hühnerpocken. Sie lassen sich davon aber gut abgrenzen, weil sie viel langsamer entstehen und deshalb jeweils zur gleichen Zeit p.i. wesentlich kleiner sind (MAYR,1963).
Beim Agapornidenpockenvirus werden bereits am 5. Tag p.i. 5-8 mm große, runde Plaques beobachtet, die ringartig von einer Zone abgekugelter Zellen umgeben sind und sich dadurch scharf von dem nichtinfizierten Zellrasen abheben. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen im Inneren der Plaques degeneriert und abgekugelt, jedoch soweit erhalten, daß bei der Färbung noch Neutralrotlösung aufgenommen wird (KRAFT,1971).

Neutralisationstest:

Mit Hilfe einer geeigneten Versuchsanordnung kann die Neu-

tralisationsreduktion in der Zellkultur zur Differenzierung von Pockenviren herangezogen werden. WOODROOFE und FENNER (1962), MAYR und MAHNEL (1970), UPPAL und NILAKANTAN (1970) und DUNLAP und BARKER (1973) fanden eine stärkere Neutralisation der Immunseren gegenüber den homologen Pockenviren, jedoch auch eine geringe Pockenherdreduktion durch heterologe Seren und keine Pockenherdreduktion durch Immunseren gegen andere Virusstämme als Geflügelpocken. Der Test kann als Virus- wie auch als Serum-Neutralisation durchgeführt werden. Die „in vitro-Gemische" werden in 11 Tage alten Hühnerembryonen (MAYR und MAHNEL, 1970 und RINALDI et al, 1972) oder in Hühnerembryofibroblastenkulturen ausgewertet (TRIPATHY et al, 1973).

Plaquereduktionstest:

Die Plaquereduktion mit homologen oder heterologen Geflügelpockenseren wird anhand der Agar-Overlay-Technik durchgeführt. Eine starke Plaquereduktion durch Pockenimmunseren gegenüber den homologen Viren (um 90%), eine geringere Reduktion gegenüber heterologen Geflügelpockenstämmen, und keine Reduktion der durch andere Viren verursachten Plaques ist feststellbar (KRAFT, 1971).

Physikalisch-Chemische-Eigenschaften:

Gegen Lösungsmittel findet sich bei allen Avipoxviren ein ähnliches Verhalten. Sie zeigen Resistenz gegenüber Trypsi

und eine relative Resistenz gegenüber Äther. Alle Pockenviren sind chloroformlabil (BÖGEL und MAYR, 1961; MAYR, 1962 und 1963; HERRLICH, 1967 und KRAFT, 1971). Hinsichtlich der Thermoresistenz und Lagerfähigkeit bestehen Unterschiede zwischen den einzelnen Pockenvirusstämmen. Die geringste Haltbarkeit dürfte das Taubenpockenvirus besitzen (MAYR, 1962).

Züchtung in Kulturen verschiedener Zellarten:

Nach den Untersuchungen von BAXENDALE (1971) können Hühnerpockenvirus außer in Hühnerembryofibroblasten ohne Unterschiede von Titer und cytopathischem Effekt auch in Entenembryofibroblasten gezüchtet werden, nur war in letzteren die Inkubationszeit um 1-2 Tage verlängert. Höhere Titer und eine bessere immunogene Wirkung können nach EL-ZEIN et al., (1974) nach Vermehrung von Hühnerpockenvirus in Hühnerembryodermiszellen erzielt werden. Hier ist auch vermehrtes Auftreten von Einschlußkörpern zu beobachten.

Färbung mit Fluoreszein gefärbten Antikörpern

Der direkte Fluoreszenztest wurde zum Nachweis vom Vacciniavirus (NOYE & WATSON, 1955, LOH & RIGGS, 1961, WOODROOFE & FENNER, 1962 und MURREY, 1963) und Hühnerpockenvirus nach 8-24 Stunden p.i. in Hühnerembryofibroblasten benutzt (WOODROOFE & FENNER, 1962 und TRIPATHY et al., 1970).

Nachweis von Einschlußkörperchen

Bollingersche Einschlußkörperchen sind bei Pockenviren im Zytoplasma der Epithelzellen der Haut nachweisbar. Die Funktion der Einschlußkörperchen scheint zu sein, unreife Frühformen mit einer Doppelmembran zu umhüllen und somit in die reife Form zu überführen (SIMPSON, 1969).
In der Zellkultur können spezifische Plasmaeinschlüsse ab 72 Std. p.i. mittels H&E Färbung nachgewiesen (CHANG, 1970) werden. EL-ZEIN et al. (1974) beschreiben eine besonders gute Darstellung von Hühnerpocken-Einschlüssen in Hühnerembryodermiszellen.

Eikultur:

Im Verhalten der Geflügelpockenviren in der Eikultur finden sich Unterschiede besonders hinsichtlich Inkubationszeit, Aufbau und Größe der Primärherde, Zeitpunkt und Ausmaß der Generalisierung, Absterberate sowie Ringzonen- und Einschlußkörperbildung, die für die Differenzierung der Stämme wertvolle Hilfsmittel sind (HERRLICH und MAYR, 1955; MAYR und WITTMANN, 1956; MAYR, 1963; MAYR, 1964 und HERRLICH, 1967).

Nachweis der präzipitierenden Antikörper:

Agar-Diffusion stellt eine wertvolle Hilfe für die Diagnose der einzelnen Virusarten der Geflügelpocken dar. Die Immunseren reagieren stärker oder ausschließlich gegen das

homologe Virus (WOERNLE, 1961; SCHMIDT, 1969 a-b; UPPAL und NILAKANTAN , 1970 und KRAFT, 1971).

Verhalten in Versuchstieren:

MAYR (1960, 1963 und 1964) machte für die Geflügelpockenviren und Vaccinia virus eine Analyse des Wirtsspektrums durch Infizierung von Eintagsküken, 12 Wochen alte Hühner und Puten, sowie Tauben, Enten, Kanarienvögel und Kaninchen. Folgende Inokulationsmehtoden wurden verwendet: kutan, intramuskulär, intravenös und intracerebral. Auf diese Weise war es ihm möglich erhebliche Unterschiede bei den Avipoxarten festzustellen.

MATERIAL UND METHODEN

Virusstämme:

Für vergleichende Untersuchungen arbeiteten wir mit den Referenzstämmen HP_1, PP_1, TP_1, QP_1, KP_1, AP/III-5. [1] Das Isolat VK 984/76 stammt aus Pockenläsionen an den Ständern eines Sakerfalken (Hierofalco cherrug). Das Isolat 1671/76 stammt aus Organen (Leber, Lunge, Niere und Milz) eines importierten Rotflügelsittichs (Aposmictus erythropterus) von einer Quarantäne Station. Außerdem wurde kurzfristig mit einem aus Mülleramazonen isolierten Stamm gearbeitet. Wegen ND-Kontamination mußten hier die Untersuchungen abgebrochen werden.

Immunseren:

Mit den oben bezeichneten Stämmen wurden SPF-Hühner eigener Aufzucht hyperimmunisiert (WINTEROLL et al., 1979).

---

1) Für die freundliche Überlassung der originären Geflügelpockenstämme bedanke ich mich herzlich. Die Stämme für HP, TP, PP, KP und QP stammen von Prof. Mayr und Prof. Mahnel in München. Der Agapornidenstamm wurde uns freundlicherweise von Prof. Monreal und Prof. Kraft in Berlin zur Verfügung gestellt.

Zellkulturtechniken:

Primärzellkulturen und Kulturen zur Viruszüchtung wurden im geschlossenen System bei 37,8 °C gehalten.
Zur Beurteilung cytopathischer Veränderungen, von Titrationen, von Plaquetests und Neutralisationstests wurden Zellen im offenen System mit Zufuhr von CO_2-O_2-Gemisch bei 5% CO_2 Atmosphäre kultiviert. Außerdem wurde die Virus-Vermehrung vergleichend bei Temperaturen von 37,8 und 39°C untersucht.

Material:

Kulturkolben nach Roux, Kulturröhrchen aus Duran-Glas, oberflächenbehandelte Petrischalen und Mikroplatten aus Polysterol (Fa. Nunc).

Reagentien:

Sterile PBS pH 7.3
Trypsin 0,25%ig in PBS (PBST)
Trypsin-Versen Mischung (Mikrobiol. Arbeitsmeth., MAYR et al, 1972)
Medium 199, F10

Earle's A:	NaCl	68,0 g
	KCl	4,0 g
	$NaHCO_3$	22,0 g

	$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	1,65 g
	Glukose	10,0 g
	Bidest	1000 ml
Earle's B:	CaCl	4,0 g
	$MgSo_4 \times 7H_2O$	4,08 g
	Bidest	1000 ml

In 500 ml Medium sind enthalten:

0,62 g LAH (TC Lactalbuminhydrolysate, Bacto)

0,375 g TPB (Tryptosephosphate Broth, dehydrated)

1,26 g F 10 (TC Medium HAM F 10, dehydrated)

4% Earle's A

2% Earle's B

0,35 g Bikarbonat

Alle Medien wurden vor Gebrauch bei 37°C im Wasserbad gehalten.

Zellkulturen:

Die verschiedenen Pockenstämme wurden in folgenden Zellkultursystemen vergleichend verwendet.

1) Hühnerembryofibroblasten (HFE): Sie wurden von 9-10 Tage alten Hühnerembryonen nach der Methode von MAYR und KALCHER (1960) hergestellt. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich in Sekundärkulturen durchgeführt. Normalerweise war der Zellrasen nach 24 Stunden dicht und

konnte infiziert werden.

2) Hühnerembryoherzzellen: (Nach EL HAG ALI, 1967)
Sie wurden aus 10 Tage alten Embryonen gewonnen, die mit der Schere zerkleinert und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur trypsiniert (0,25%ige Trypsinlösung) wurden. Daraufhin wurden die aufgeschlossenen Zellen filtriert, durch niedertourige Zentrifugation gewaschen, in Anzüchtmedium aufgenommen und in einer Dichte von ca. 10^6 Z/ml. ausgesät. Das Anzüchtmedium enthielt 20% Kälberserum. Der Zellrasen war nach etwa 3 Tagen geschlossen.

3) Hühnerlungenzellen: (Nach EL HAG ALI, 1967)
Sie wurden aus 16 Tage alten Embryonen gewonnen und wie Herzzellen aufgearbeitet.

4) Hühnerchorioallantoismembranzellen: Es wurde erstmals der Versuch unternommen, Zellen aus Chorioallantoismembranen von 9-10 Tage alten embryonierten Eiern zu kultivieren. Sie wurden aseptisch entnommen, mit der Schere sehr fein zerkleinert, zweimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur 4x mit 0,25% Trypsinlösung aufgeschlossen (30, 10, 10 und 5 Minuten). Der Filtration durch zweifache Gaze folgte eine niedertourige Zentrifugation der Zellen, die dann wieder in Anzuchtmedium resuspendiert und in einer Konzentration von etwa $1x10^6$ Z/ml ausgesät wurden. Der Zellrasen war im Durchschnitt nach 2 Tagen dicht

ausgewachsen und konnte inokuliert werden. Hier wurde mit Primärzellen gearbeitet. Eine Subkultivierung dieser Zellen zu Sekundär- und Tertiär-Zellen war nach Behandlung mit Trypsin-Versen Gemisch möglich.

5) Hühnerembryodermiszellen:

Sie wurden im Prinzip nach der von EL-ZEIN et al.(1974) beschriebenen Methode gewonnen. Embryohautstücke wurden mit der Schere zerkleinert und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur trypsiniert. Danach wurde die Zellsuspension gesammelt, durch Gaze filtriert, in Anzuchtmedium resuspendiert und etwa 800 000 Zellen/ml ausgesät.

6) Moschusentenembryofibroblasten:

Sie wurden aus 16 Tage alten SPF-Moschusentenembryonen gewonnen. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich in Primär- und Sekundär-Zellkulturen durchgeführt.

7) Wellensittichembryofibroblasten:

Sie wurden von 7-9 Tage alten Wellensittichembryonen hergestellt. Der Zellrasen war nach etwa 2 Tagen dicht gewachsen und konnte infiziert werden. Eine Subkultivierung dieser Zellen war mit Trypsin-Versen Mischung möglich. Die Wellensitticheier stammten von Liebhaberzüchtern und waren naturgebrütet. Alle Wellensittichzellen wurden parallel in SPF-Hühnereikulturen auf Freisein von Virus getestet.

Virustitration:

Zur Titerbestimmung wurden von den zu testenden Viren 10er Verdünnungsstufen in PBS ohne Ca^{++} und Mg^{++} hergestellt. In Mikroplatten kultivierte, ca. 24 h alte sek. HFE wurden mit den Virusverdünnungen infiziert, nach einer Adsorptionszeit von 1 h bei 37°C mit PBS gewaschen und mit Erhaltungsmedium beschickt. Die Auswertung erfolgte nach Ausbildung des cytopathischen Effektes bei einer Beobachtungszeit von 6-8 Tagen. Die kulturinfektiöse Dosis (KID_{50}) wurde nach der Methode von SPEARMANN und KAERBER berechnet.

Untersuchungen zur Kinetik der Virusvermehrung der beiden Pockenisolate:

Das zellfreie Virus wurde durch Absaugen des Mediums und durch zweimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS nach 6, 18, 24, 36, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden gewonnen. Medium und Waschflüssigkeit wurden bei -20°C bis zur Titrierung eingefroren. Auf den gewaschenen Zellrasen wurden 2,5 ml PBS pipettiert. Die Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen, 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert und aus dem Überstand der zellgebundene Virusgehalt bestimmt.

Neutralisationsversuche:

Diese wurden sowohl als Serumneutralisationstests als auch als Virusneutralisationstests durchgeführt. Hierzu wurde einmal eine Serumverdünnungsreihe (log. 10) mit einer konstanten Virusmenge (100 KID_{50}) inkubiert und im Plattentest nach Auftreten von CPE der Neutralisationstiter bestimmt.

Zum anderen wurde durch Inkubation einer Virusverdünnungs-

reihe (log. 10) mit konstanter Serummenge (1:4) der Neutralisationstiter bestimmt. Parallel dazu wurden Virus- und Serum-Kontrollen durchgeführt. Die Neutralisation wurde sowohl ohne als auch mit Zusatz von 10% Komplement durchgeführt. Ohne Komplement wurde die Virus-Serummischung vor Infektion der Zellen 2 Std. bei 37C° inkubiert. Bei Komplementzusatz wurde 2 Std. bei 37C° und über Nacht bei 4C° inkubiert.

Charakterisierung der Viren durch biochemische Methoden und andere Eigenschaften:

Chloroformresistenztest:
Virussuspensionen (Zellkulturmaterial) wurden mit 10% Chloroform, bei 4C° für 1 Std. geschüttelt und im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Das Material wurde 45 Minuten bei 2200 g zentrifugiert. Die obere wässerige Phase wurde auf dicht gewachsenen HFE-Zellen titriert. Eine gleichzeitige Titrierung des Ausgangsmaterials diente als Kontrolle.

Ätherresistenztest:
Virussuspensionen wurden zu 10% mit Äther versetzt, bei 4C° geschüttelt und über Nacht belassen. Dann wurde der Äther in einer Petrischale bei Raumtemperatur verdampft und das Restmaterial auf Zellen titriert. Eine Kontrolle wurde wie oben angelegt.

Hitzeresistenztest:

Virussuspensionen wurden bei 56C° für 15, 30 und 60 Minuten im Wasserbad belassen und auf Zellen titriert. Eine Titrierung des Ausgangsmaterials diente als Kontrolle.

Plaquereduktionstest:

Durch Vorversuche wurde die Virusdosis ermittelt, bei der etwa 100 Plaques pro Petrischale ausgezählt werden konnten. Antiseren wurden 1:4 vorverdünnt und im Verhältnis 1:1 der ermittelten Virusverdünnung zugegeben. Die Mischung wurde 2 Std. bei 37°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurden je 2 Schälchen mit den Mischungen infiziert, 1 Std. bei 37°C inkubiert zweimal mit erwärmtem PBS gewaschen und mit agarhaltigem Medium überschichtet. Die Plaques wurden gezählt und die Plaquereduktion in Prozent ausgedrückt.

Färbung mit Fluoreszein gefärbten Antikörpern

Das Antigen wurde 24 Std. p.i. nachgewiesen. Nach der Methode von THIEL und SMITH (1967) wurden die infizierten Zellen nach der indirekten Methode gefärbt und ausgewertet.

Mikroskop-Angabe:
Leitz-Ortholux Mikroskop mit original Leitzfluoreszensaus-

rüstung, bei Dunkelfeld und Durchlicht.
Okular 10x, Objektiv 54, Erregerfilter BG 12 und BG 38, Sperrfilter 510, Quecksilberdampfdrücklampe HBO 200 (Fa. Osram). Außerdem wurde fluoreszenzfreies Immersionsöl nD - 1,515 verwendet.

ERGEBNISSE

Vergleichende Vermehrung in der Zellkultur:

Das Falkenisolat zeigte sich während 13 Passagen in sek. HFE nur schwach cytopathogen. 5-6 Tage p.i. traten einzelne, gelblich-braun pigmentierte Herde mit proliferativem Charakter auf, welche sich am 8.-9. Tag aus dem Zellverband lösten. Die Virusvermehrung ließ sich weder mit DEAE noch mit sterilem Eidottermaterial stimulieren. Die Prüfung des Mediums auf eventuell vorhandene Hemmungsfaktoren verlief negativ. Nach kutaner Infektion von Eintagsküken mit Zellkulturmaterial zeigten diese 8 Tage p.i. eine positive Reaktion. Davon konnte das Virus mit deutlichem CPE in der Zellkultur rückisoliert werden.

Das Psittacidenpockenisolat ließ sich während der ganzen Untersuchungen nur schlecht in sek. HFE vermehren. Trotz mehrfacher Passagen (8) mit kürzeren und längeren Intervallen und dazwischen liegenden Einfrier- und Auftauphasen konnten nur niedrige Titer erzielt werden.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen über die Vermehrung der originären Pockenviren und der aus einem Falken und einem Rotflügelsittich stammenden Isolate in sek. HFE sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Vergleichende Untersuchungen des Verlaufs cytopathischer Veränderung in sekundären Hühnerembryofibroblasten

	Falkenpocken	Psitt.Pocken	Hühnerpocken	Taubenpocken	Putenpocken	Kanarienpocken	Agapornispocken
Auftreten des CPE. Aussehen des CPE	4 T.p.i. Lok. Proliferation von Einzelzellen. Granulation und Abkugelung (Abb. 1)	2-3 T.p.i. Lok. Proliferation von Zellverbänden, gelbbraune Pigment. Abkugelung, tw. Bildung von Blebs. (Abb. 2)	2-3 T.p.i. Deutliche Abkugelung mit langsamer Lysis (Abb. 3)	3 T.p.i. Kleine Herde abgekugelter Zellen mit lytischen Bezirken (Abb. 4)	3 T.p.i. Die Abkugelung ist deutlicher ausgeprägt aber verläuft sehr langsam	2 T.p.i. Keine deutliche Abkugelung, aber einzel. Verfall (Abb. 5)	2 T.p.i. Deutliche Abkugelung und schneller Zelllysis (Abb. 6)
Generalisierung Zerstörung der Kultur	7 T.p.i. nur mit hohen Inokulationsdosis nach 8-9 T.p.i.	5-6 T. p.i. 8 T.p.i.	6 T.p.i. 7-8 T.p.i.	6 T.p.i. 7-8 T.p.i.	6-7 T.p.i. 9-10 T.p.i.	3 T.p.i. 3-4 T.p.i.	3 T.p.i. 4 T.p.i.
Auftreten von EK	48 Std. p.i.	24-48 Std. p.i.	48 Std. p.i.	48 Std. p.i.	48 Std.p.i.	24 Std.p.i.	24 Std. p.i.
Aussehen der EK	Eos. intrazytoplasmatisch, verschiedene Größe (Abb. 7)	Hauptsächlich basophile EK, mit deutlichem Hof. (Abb. 8)	Eosinophile-intrazytoplasmatische EK (Abb. 9)		verschiedener Größe		Hauptsächlich eosinophile EK mit deutlichem Hof (Abb. 10)

Vermehrung in verschiedenen Zellarten:

Die Isolate Falkenpocken VK 984/76 und Psittacidenpocken 1671/76 und orig. aviäre Pockenviren wurden gleichzeitig mit gleicher Animpfdosis in Sekundärhühnerembryofibroblasten, Moschusentenembryofibroblasten, Wellensittichembryofibroblasten, Zellen von CAM, Dermisembryofibroblasten und Herzzellen von Hühnerembryonen vermehrt. HP, TP, PP und Falkenpocken wurden 5 Tage p.i. und KP, AP und Psitt-pocken 3 Tage p.i. titriert.

Tabelle 2: Titerbestimmung (log.10) in verschiedenen Zellsystemen

	HP	TP	PP	KP	AP	FP	Psitt.P
FHE	5,17	4,50	4,67	6,17	4,33	4,50	5,17
MFE	5,50	4,17	4,97	5,87	3,17	5,00	4,97
WSFE	4,57	4,00	4,17	5,00	5,17	4,00	5,83
CAM	4,83	4,00	4,83	6,50	4,17	4,83	4,50
Dermis	5,00	4,67	4,50	5,83	4,50	4,17	4,67
Lunge	3,33	3,67	3,67	4,67	3,83	3,17	3,17
Herz	3,17	3,50	3,17	3,83	3,50	3,17	3,83

HP= Hühnerpocken, TP= Taubenpocken, PP= Putenpocken, KP= Kanarienpocken, AP= Agapornidenpocken, FP= Falkenpocken, Psitt.P.= Psittacidenpocken, HFE= Hühnerembryofibroblasten, MFE= Moschusentenfibroblasten, WSFE= Wellensittichembryofibroblasten.

Plaquebildung: Die Unterschiede in Auftreten und Aussehen von Plaques sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen im Plaquetest bei den verschiedenen Geflügelpockenarten

	Falkenpocken	Psitt-Pocken	Hühnerpocken	Taubenpocken	Putenpocken	Kanarienpocken	Agapornidenpocken
Auftreten der Plaques	8 T.p.i.	6 T.p.i.	8 T.p.i.	8 T.p.i.	8 T.p.i.	6 T.p.i.	6 T.p.i.
Aussehen der Plaques							
Durchmesser	2-3 mm	etwa 1 mm	3-5 mm	2 mm	2-4 mm	etwa 3 mm	1-2 mm
Form	unscharf begrenzt mit hellem Zentrum (Abb. 11)	scharf begrenzt als Proliferation von Zellverbänden (Abb. 12)	helles Zentrum mit dunkler Außenzone (Abb. 13)	scharf konturiert mit Lysis im Zentrum (Abb. 14)	wie HP aber langsamere Entwicklung (Abb. 15)	wenig heller Zentrum mit Ringzonenbildung	mit abgehobenem glattem Rand von abgekugelten Zellen

Neutralisationstests:

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf eine mögliche Differenzierung anhand von neutralisierenden Antikörpern sind in Tabelle 4 dargestellt. Alle Tests wurden parallel sowohl mit als auch ohne Komplementzusatz durchgeführt.

Tabelle 4a: Neutralisationstiter (log. 10) ohne Komplement (obere Ziffer) mit Komplement (untere Zahl).

	HPS	TPS	PPS	KPS	APS	FPS	PSITT.PS
HP-Virus	1,3	0	0,25	0	0	0,33	0
	1,73	0	0,42	0			
TP ""	0	1,0	0	0	0	0,52	0,22
	0,22	1,1	0	0			
PP ""	0,24	0	0,66	0	0	0,44	0
	0,33	0	0,9	0			
KP ""	0	0	0	1,67	0	0	0
	0	0	0	1,82			
AP ""	0	0	0	0	1,8	0	0,33
	0	0	0	0			
FP ""	0,22	0,33	0	0	0	1,8	0
	0,24	0,44	0,22	0,22			
Psitt.P""	0	0	0	0	0,33	0	1,67
	0	0	0	0			

Tab. 4b: Neutralisationsindex (log 10).

	HPS	TPS	PPS	PPS	KPS	APS	FPS	Psitt.PS
FP-Virus	0.37	0.45	0	0	0	0	3.03	0
Psitt.P-Virus	0	0	0	0	0	0	0	2.87

Ergebnisse der Plaquereduktionstests:

Tabelle 5 zeigt die neutralisierende Wirkung der Immunseren gegenüber den homologen und heterologen Virusstämmen, welche im Plaque-Reduktionstest ermittelt wurde.
Die Seren waren gegenüber den homologen Viren auf ca. 90 plaquereduzierende Einheiten eingestellt. Eine Ausnahme bildet das Putenpockenantiserum.

Tabelle 5: Plaque-Reduktion (in %)

	HPS	TPS	PPS	KPS	APS	FPS	Psitt.PS
HP-Virus	94	25	44	20	20	33	15
TP ""	33	85	25	25	25	40	20
PP ""	30	20	66	20	15	50	12
KP ""	25	33	22	96	20	22	15
AP ""	25	33	30	20	98	17	33
FP ""	33	36	40	16	22	90	20
Psitt.P ""	30	25	20	35	55	25	90

Größenbestimmung und biochemische Eigenschaften:

Die Ergebnisse von Größenbestimmung und Äther-, Chloroform-, Trypsin- und Hitze-Behandlung sowie Haemagglutionation- und Haemadsorptionstests der Isolate Falkenpocken und Psittacidenpocken sind in Tabelle 6 und 7 gezeigt.

Tabelle 6: Titerbestimmung (log. 10) nach Chloroform- Äther- und Hitze-Behandlung der Isolate Falkenpocken und Psitt-Pocken.

	Chloroform	Äther	Hitze auf 56°C nach 15	30	60 M.	Ko. unbehandelt
Falkenp.	0	3	4	2,83	0	4,8
Psitt.P.	0	3,17	5	3,50	2	5

Tabelle 7: Größe und biochemische Eigenschaften der Isolate Falken- und Psitt.Pocken

		Falkenpocken	Psitt.Pocken
Größen-	0,22 nm	neg.	neg.
bestimm.	0,45 nm	pos.	pos.
Hitze	30 Min.	reduziert	reduziert
auf 56 °C	60 Min.	inaktiviert	reduziert
Äther		empfindlich	empfindlich
Chloroform		labil	labil
Trypsin		stabil	stabil
Haemagg. Hühner- und Pferd-Eryth.		neg.	neg.
Haemads.		neg.	neg.

Ergebnisse vergleichender fluorszenzserologischer Untersuchungen in der Zellkultur:

Mit den homologen Antiseren war Virus-Antigen 24 Std. p.i. in der Zellen intracytoplasmatisch nachweisbar. Mit heterologen Antiseren verlief der Test negativ.

Kinetik der Vermehrung in sek. HFE:

Der Verlauf der Vermehrung des Falken- und Psittacidenpockenvirus in sek.HFE ist in Abb. 16 und 17 dargestellt.

DISKUSSION

Die Ergebnisse der chemisch-physikalischen Untersuchungen und der serologischen Untersuchungen (Fluoroszenz, Serumneutralisation und Plaquereduktion), das Verhalten in der Zellkultur und die im Elektronenmikroskop festgestellte Struktur bestätigen die Zugehörigkeit der untersuchten Virusisolate (aus einem Falken und Rotflügelsittich) zum Genus Avipox. Unsere Untersuchungsergebnisse stimmen somit mit den aufgrund klinischer und pathologisch-anatomischer Befunde gemachten Angaben von GERDESSEN (1956), RAETHEL (1962), TROMMER (1964), KUNTZE et al. (1967), COOPER (1969), HALLIWELL (1972), MOFFATT (1972), GREENWOOD & BLACKMORE (1975), PEARSON et al. (1975) und HEIDENREICH (1979) überein, wonach Greifvögel an Pocken erkranken können.

Über Pocken bei Psittaciden liegen Angaben bei SHARMA et al. (1968), KRAFT und TEUFEL (1971) und GRAHAM (1978) vor. Das von uns isolierte Virus konnte lediglich mit dem Agapornidenpockenstamm von KRAFT verglichen werden, mangels entsprechender Virusstämme nicht mit den Isolaten von GRAHAM und SHARMA.

Die Beurteilung der zu untersuchenden Isolate erfolgte in den jeweiligen Tests unter vergleichender Heranziehung von originären aviären Pockenstämmen. Aus der Summe dieser Ergebnisse geht hervor, daß die geprüften Isolate Eigenständigkeit besitzen.

Bei der Züchtung des aus Falken isolierten Pockenvirus (FP) in HFE konnte zunächst selbst nach 13 Blindpassagen kein deutlicher cytopathogener Effekt erzielt werden. Auch Zusatz von verschiedenen Stimulatoren (DEAE und Hühnereidotter) oder ein Passagenwechsel auf Moschusentenfibroblasten blieben ohne Erfolg. Erst nach Rückisolierung des Virus von kutan infizierten SPF-Eintagsküken ließ es sich mit charakteristischen Zellveränderungen kultivieren. Diese Erscheinung steht wahrscheinlich mit einer erschwerten Reaktivierung in Zusammenhang nach 2-jähriger Lagerung bei -20°C. Anschließend gelang die Passagierung in jedem Fall mit hohen Titern.

Die Züchtung des Psittacidenpockenvirus in sekundären Hühnerembryofibroblasten war ebenfalls schwierig. Es traten nur einzelne lokale Herde auf, und es erfolgte nur selten eine Generalisierung mit Zerstörung des gesamten Zellrasens. Der erhaltene Virustiter lag nur in wenigen Fällen über 10^3. Das Virus scheint nach unserer Erfahrung unter normalen Laborbedingungen eine geringe Tenazität zu besitzen, da selbst nach kurzer Lagerung ein deutlicher Titerabfall zu verzeichnen war. Eine Steigerung der Virusvermehrung konnte weder mit DEAE noch mittels anderer Stimulatoren

erreicht werden.

Bei den Untersuchungen in Zellkulturen aus Hühnerembryofibroblasten unterschied sich das Falkenpockenvirus deutlich von Kanarien-, Wachtel-, und Agapornidenpockenvirus. Einige Gemeinsamkeiten bestanden bezüglich der Zellspezifität, des zeitlichen Auftretens und des Aussehens des CPE's mit dem Hühner-, Puten- und Taubenpockenvirus, doch waren auch wesentliche Unterschiede festzustellen. Der cytopathogene Effekt des Falkenpockenvirus trat 4 Tage p.i. in Form von Proliferation, Granulation, Abkugelung und Zelllysis einzelner Herde auf. Die Generalisierung begann 7 Tage p.i. Eine ähnliche Inkubationszeit und Generalisierungsdauer konnte beim Putenpockenvirus beobachtet werden. Während jedoch bei diesem Virus die Abkugelung deutlicher ausgeprägt war, stand bei den Kulturveränderungen durch das Falkenpockenvirus die Zellysis im Vordergrund. Der maximale Titer wurde 5 Tage p.i. erreicht.

Der cytopathogene Effekt des Psittacidenpockenvirus war nach 2-3 Tagen p.i. als lokalisierte Proliferation von Zellverbänden mit Abkugelung und teilweiser Bildung von "Blebs" ausgeprägt. Eine Generalisierung erfolgte nur mit sehr hohen Inokulationsdosen 7-8 Tage p.i..Aussehen und Verlauf der beobachteten Zellveränderungen glichen keinem der originären Pockenviren. Der maximale Titer des zellfreien Virus wurde 7 Tage p.i. erreicht.

Das Auftreten biologischer Unterschiede von Viren bei Züchtung auf verschiedenen Zellsystemen ist bekannt. So gelang es EL HAG ALI (1967) nach Inokulations vom Virus N in Hühnernierenzellen einen cytopathischen Effekt hervorzurufen, nicht aber in embryonalen Hühnerfibroblasten. Höhere Virustiter und bessere immunogene Wirkung konnten nach EL-ZEIN et al. (1974) bei Vermehrung von Hühnerpocken in Hühnerembryodermiszellen statt in HFE erzielt werden, gleichzeitig war auch vermehrtes Vorkommen von Einschlußkörperchen zu beobachten. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die vorliegenden Pockenvirusstämme in verschiedene Zellsysteme nämlich in Hühnerembryofibroblasten, Moschusentenfibroblasten, Hühnerembryodermiszellen, Hühnerembryoherzzellen, Hühnerembryolungenzellen, Hühnerchorioallantoismembranzellen und Wellensittichembryofibroblasten inokuliert um ihr biologisches Verhalten in den unterschiedlichen Kulturen zu vergleichen. Generell ließen sich alle untersuchten Stämme in HFE, MFE, Dermis-, CAM- und Wellensittichzellen besser vermehren als in Herz-und Lungenzellen. Vermehrtes Vorkommen von Einschlußkörperchen war in MFE, Dermis- und CAM-Zellen zu beobachten. Höchste Titer in MFE wurde nach Infektion mit Falkenpocken-, Hühnerpocken- und Putenpockenvirus erzielt. Für das Agapornidenpocken- und für Psittacidenpockenvirus wurden höchste Tier in Kulturen aus Wellensittichembryofibroblasten erreicht. Auftreten und Aussehen der cytopathischen Veränderungen aber unterschieden sich bei den beiden Viren deutlich.

Die vergleichenden Untersuchungen über die Plaquebildung der einzelnen Pockenstämme ergaben deutliche Unterschiede hinsichtlich des zeitlichen Auftretens dieser Veränderungen. Während MAYR (1963) eine Auswertung der Hühner-, Puten- und Taubenpockenplaques erst am 11. Tag p.i. vornehmen konnte, gelang dies in vorliegenden Untersuchungen für Hühner-, Puten-, Tauben- und Falkenpockenplaques bereits nach einer 8-tägigen Bebrütungszeit. Bei Psittacidenpockenplaques konnte die endgültige Beurteilung bereits 6-7 Tage p.i. durchgeführt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den vergleichenden Untersuchungen von KRAFT (1971) überein. Die zeitlichen Unterschiede im Auftreten der Plaques können mit der Verschiedenheit der Nährmedien zusammenhängen; in den vorliegenden Versuchen wurden die gleichen Medien wie bei KRAFT (1971) verwendet. Das bestätigt die Notwendigkeit, Pockenstämme für vergleichende Untersuchungen gleichzeitig und unter denselben Bedingungen anzuzüchten. Hinsichtlich des sehr späten zeitlichen Auftretens der Plaques ähnelte das Falkenpockenvirus dem Putenpockenvirus. Seine Plaqueform und -größe aber wies mehr Gemeinsamkeit mit dem Taubenpockenvirus auf. Die Psittacidenpockenplaques wichen im zeitlichen Auftreten völlig von den übrigen Pockenviren ab. Ihre Gestalt ähnelte dem der Falken- und Taubenpockenviren. Sie waren aber etwas kleiner.

Hinsichtlich der Größe und der biochemischen Eigenschaften zeigten beide Isolate Übereinstimmung mit den originären Viren der Avipox-Gruppe.

Die Ergebnisse der Neutralisationsversuche bestätigten die Befunde in Zellkultur und im Plaquetest. Das Falkenpockenvirus und das Psittacidenpockenvirus zeigte jeweils eine spezifische Neutralisation (1,8 $\log_{10}$ beim Falkenpockenvirus und 1,67 $\log_{10}$ beim Psittacidenpockenvirus) durch das homologe Antiserum. Es bestand zwar auch eine neutralisierende Wirkung der Psittacidenpockenantiseren gegen heterologe Pockenstämme. Gegenüber den homologen Viren erfolgte jeweils eine mehr als doppelt so starke Neutralisation. Durch Komplementzusatz konnte eine Steigerung des Neutralisationstiters bis zu 0,43 $\log_{10}$ erzielt werden. Eine neutralisierende Wirkung von Hühner-, Tauben- und Putenpockenserum bestand gegenüber dem Falkenpockenisolat. Sie war aber jeweils wesentlich geringer als gegen das homologe Virus. Eine Plaquereduktion um 90% gegenüber dem homologen Virus wurde durch spezifische Falken- bzw. Psittacidenpockenantiseren festgestellt, während mit heterologen Seren weniger als 50% Plaquereduktion zu beobachten war. Ähnliche serologische Beziehungen innerhalb der aviären Pockenuntergruppe fanden UPPAL und NILAKANTAN (1970), KRAFT (1971) und DUNLAP und BARKER (1973).

Die vorliegenden Untersuchungen besagen, daß das Psittacidenpockenvirus ein eigenständiges Pockenvirus ist. Es wächst besonders gut auf Wellensittichzellen und unterscheidet sich durch die zellspezifischen Veränderungen deutlich vom Agapornidenpockenvirus. Ob man indessen das Isolat als spezifisches Pockenvirus der Psittaciden bezeichnen kann,

muß durch weitere Untersuchungen besonders durch Ermittlung des Wirtsspektrums geklärt werden.

Wie die Untersuchungen über das Falkenpockenisolat gezeigt haben, sind hier stärkere Gemeinsamkeiten mit Hühner-, Puten- und Taubenpockenviren festzustellen. Diese Gruppe der aviären Pockenviren zeichnet sich durch größere gegenseitige Übereinstimmung aus. Das Falkenpockenvirus läßt sich aufgrund des Verhaltens in der Zellkultur mit größter Wahrscheinlichkeit als eigenständiges Virus dieser Gruppe zuordnen. Es kann von ihr nur durch Heranziehung mehrerer Kriterien sicher abgetrennt werden.

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, daß mit einiger Erfahrung und Kenntnissen über das Verhalten der verschiedenen Avipoxviren "in vitro", und durch Arbeiten mit streng standardisiertem Material und mehreren Methoden eine Differenzierung zwischen den einzelnen aviären Pockenviren besonders bei Heranziehung von serologischen Methoden möglich ist. Eine notwendige Voraussetzung ist allerdings das Gelingen der Adaptation an die entsprechenden Zellsysteme. Wir befinden uns in dieser Hinsicht in Übereinstimmung mit MAYR und auch mit TRIPATHY. Letzter betont vor allem die dabei auftretenden Schwierigkeiten.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwei Virusisolate aus einem Falken und einem Rotflügelsittich wurden anhand ihrer Vermehrung in Hühnerembryofibroblästen, des Verhaltens in verschiedenen Zellsystemen, der Plaquebildung, der physikalisch-chemischen Eigenschaften und anhand serologischer Untersuchungsergebnisse als Pockenviren identifiziert und näher charakterisiert. Dazu wurden vergleichende Untersuchungen mit bekannten Avipoxviren nämlich: Hühner-, Puten-, Tauben-, Wachtel-, Kanarien- und Agapornidenpockenstämmen durchgeführt. Die oben genannten Isolate ließen sich mit deutlich sichtbarem CPE in Hühnerembryofibroblasten vermehren. Das Falkenpockenvirus unterschied sich deutlich vom Kanarien-, Wachtel- und Agapornidenpockenvirus. Trotz einiger Gemeinsamkeiten mit Hühner-, Tauben- und Putenpockenvirus zeigte das Virus Eigenständigkeit. In Wellensittichembryofibroblasten als Kultursystem erreichte das Psittacidenpockenisolat ebenso wie der Agapornidenpockenstamm III/5 die höchsten Titer. Bei den meisten geprüften Eigenschaften bestanden wesentliche Unterschiede gegenüber den verwendeten Vergleichsstämmen. Das Psittacidenpockenvirus ist ein neuer aviärer Pockentyp.

SUMMARY

On the bases of growth in chicken embryo monolayers, the behaviour in different cell systems, plaque formation, physical and chemical properties and serological tests were two isolates from falcons and psittacine birds identified as avian pox viruses. The isolates were comparatively investigated with the known avian pox viruses like fowl, pigeon, turkey, quail, canary and agapornis virus strains. They multiplied in chicken embryo monolayers with characteristic cytopathic effect. The falcon pox virus was clearly distinguishable from canary, quail and agapornis pox virus. The virus behaviour was similiar but not identical to that of fowl, turkey and pigeon pox viruses. The pox virus isolate from psittacine birds as well as the agapornis pox virus multiplied in budgerigar embryo cells with high titers, moreover were no similarities with the other pox strains and it is considered as a new independent avian pox virus type.

LITERATURVERZEICHNIS

BAMBERGER,K. and P. MARKOVITS
Studies on tissue-culture-propagated turkey-pox virus Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 15, 161 (1965).

BANG,F. B., ELLEN LEVY and G. O. GEY
Some observations on host-cell-relationships in fowl pox.
I. Growth in tissue culture
II. The inclusion produced by the virus on the chick chorio-allantoic membrane.
J. Immunol. 66, 329 (1951).

BAXENDALE,W.
Studies of three avian viruses and the development of an improved fowl pox vaccine
Vet Rec. 88, 5 (1971).

BÖGEL,K. und A. MAYR
Untersuchungen über die Chloroformresistenz der Enteroviren des Rindes und des Schweines
Zbl. Vet. Med. 8, 908 (1961).

CHANG,Pei W. and V. JASTY
Multiplication of fowl pox virus in chicken embryo fibroblastic cell cultures

Am. J. Vet. Res. 31, 1463 (1970).

COOPER,J. E.
Two cases of pox in recently imported peregrine falcons (Falco peregrinus)
Vet. Rec. 85, 693 (1969).

DOYLE,T. M., N. DOBSON and R. MARTIN
Fowl pox tissue culture vaccine
Vet. Rec. 74, 359 (1963).

DUNLAP,R. C. and L. F. BARKER
Vaccinia virus strain differences
I. Neutralization of vaccinia virus strains by homologous and heterologous antisera
Archiv f. d. ges. Virusforschung 42, 107, (1973).

EL HAG ALI,B.
Biologische Eigenschaften des Virus N
Gießen: Vet. Med. Diss. (1967).

EL-ZEIN,A., S. NEHME, V. GHORAIB, S. HASBANI and B. TOTH
Preparation of fowl pox vaccine on chicken-embryo-dermis cell culture
Avian Dis. 18, 495 (1974).

GAFFORD,L. G., F. SINCLAIR and C. C. RANDALL
Growth cycle of fowlpox virus and changes in

plaque morphology and cytopathology by contaminating mycoplasma
Virology 37, 464 (1969).

GELENCZEI, E. F. and H. N. LASHER
Comparative studies of cell-culture propagated avian pox viruses in chickens and turkeys.
Avian Dis. 12, 142 (1968).

GERDESSEN, A.
Beitrag zur Entwicklung der Falknerei und der Falkenheilkunde.
Diss. Hannover (1956).

GRAHAM, C. I. G.
Pox infection in a spectacled amazone parrot (Amazona albifrons)
Avian Dis. 22, 340 (1978).

GREENWOOD, A.G. und W. F. BLACKMORE
Pox infection in falcons
Vet. Rec. 93, 468 (1973).

HALLIWELL, W. H.
Avian pox in an immature redtailed hawk
J. Wildl. Dis. 8, 104 (1972).

HEIDENREICH, H.

Pockenvirusinfektion bei Greifvögeln
Deutsche Vet. G. Tagung - Krankheiten der Vögel.
München 7. und 8. März 1979.

HERRLICH, A.

Die Pocken
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967).

HERRLICH, A. und A. MAYR

Die Differenzierung der Tierpockenviren im bebrüteten Hühnerei.
Arch. Hyg. (Berl.) 139, 444 (1955).

KIRMSE, P.

Host specificity and pathogenicity of pox virus from wild birds.
Bull. Wildl. Dis. Assoc. 5, 376 (1969).

KIRMSE, P.

Host specifity and long persistence of pox infection in the flicker (colaptes anratus)
Bull. Wildl. Dis. Assoc. 3, 14 (1967).

KÖHLER, H. und W. SCHWÖBEL

Multiplication of fowl pox virus in tissue culture
Zbl. Bakt. I Orig. 166, 454 (1956).

KRAFT,V.

Untersuchungen zur Differenzierung eines von Zwergpapageien isolierten Pockenvirus
Vet. Med. Diss. Berlin (1971).

KRAFT,V. und P. TEUFEL

Nachweis eines Pockenvirus bei Zwergpapageien (Agapornis personata und Agapornis roseicollis)
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 83 (1971).

LOH,P. C. and J. L. RIGGS

Demonstration of the sequential development of vaccinial antigens and virus in infected cells. Observations with cytochemical and differential fluorecent producers
J. Exptl. Med. 114, 149 (1961).

MAYR,A.

Verhalten von Hühner-, Tauben und Kanarienpocken im Küken nach intravenöser Impfung.
Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 178, 149 (1960).

MAYR,A.

Untersuchungen über die Lagerfähigkeit von Geflügelpockenviren im nativen Zustande.
Mh. Tierheilkde. 14, 332 (1962).

MAYR,A.
Neue Verfahren für die Differenzierung der Geflügelpocken
Berl. Münch. Tierärztl. Wsch. 76, 316 (1963).

MAYR,A.
Beziehungen zwischen Ringzonenphänomenen und Interferon
Zbl. f. Bakt., 1 Orig. 195, 227 (1964).

MAYR,A., P.A. BACHMANN, B.BIBRACK und G. WITTMANN
Virologische Arbeitsmethoden Band I
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1974)

MAYR,A. und KALCHER,K.
Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur.
Arch. f.d.ges. Virusforschung 10, 72 (1960).

MAYR,A. und K. KALCHER
Plaque-Bildung bei den Geflügelpockenviren
Arch. f.d.ges. Virusforschung 11, 307 (1962).

MAYR,A. und H. MAHNEL
Charakterisierung eines vom Rhinozeros isolierten Hühnerpocken.
Arch. f.d.ges. Virusforschung 31, 51 (1970).

MAYR,A. und G. WITTMANN
Zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion im bebrüteten Hühnerei bei verschiedenen Stämmen.
Mh. Tierheilkd. 8, 264 (1956).

MOFFATT, R. E.

Natural pox infection in a golden eagle
J. of Wildl. Dis. 8, 161 (1972).

MORITA, C.

Studies on fowlpox viruses
I. Plaque formation of fowlpox virus on chick embryo cell cultures.
Avian Dis. 17, 87 (1973).

MURREY, H.G.S.

The diagnosis of small pox by immunofluorescence
Lancet 1, 847 (1963).

NOYE, W.F. and B. K. WATSON

Studies on the increase of vaccinea virus in cultured human cells by means of the fluorescent antibody technique
J. Exptl. Med. 102, 237 (1955).

PEARSON, G.L., D. A. PASS and E. C. BEGGS

Fatal pox infection in a rough-legged hawk
J. of Wildlife Dis. 11, 224 (1975).

PORTERFIELD, J. and A. ALLISON

Studies with Poxviruses by an improved Plaque Technique
Virolgy, 10, 233 (1960).

RAETHEL, H. S.

in: BRÜLL H.: Die Beizjagd

Berlin, Hamburg: Parey, 118 (1962).

RINALDI, A., H. MAHNEL, L. NARDELLI, G.C. MANDELLI, S. CERVIO und A. VALERI

Charakterisierung eines Wachtelpockenvirus

Zbl. Vet. Med. B, 19, 199 (1972).

SAAR, Ch. (1965)

Zit. nach STEHLE S.

Krankheiten bei Greifvögeln (Accipitres) und bei Eulen (Striges) mit Ausnahme der parasitären Erkrankungen

Hannover Vet. Med. Diss. (1965).

SHARMA, U. K., J. SIMON and L. E. HANSON

Histologic study of tissue reaction in canaries and chicken embryos infected with a pox agent isolated from parakeets

Avian Dis. 12, 594 (1968).

SCHMIDT, U.

Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Gewebekulturantigenen zum Nachweis der Infektiösen Bronchitis, Infektiösen Laryngotracheitis, Geflügelpocken- und CELO-virusinfektion mit Hilfe des Agar-Gel-Präzipitationstestes.

Arch. exp. Vet. Med. 23, 1095 (1969) a.

SCHMIDT, U.

Die Agar-Gel-Präzipitationsreaktion in der praktischen Diagnostik der Geflügelpocken. Arch. exp. Vet. Med. 23, 1085 (1969) 6.

SIMPSON, C. F.

Fowl pox inclusion-body formation in skin epithelium of chicks
Avian Dis. 13, 89 (1969).

THIEL, J. F. and SMITH K. O.

Fluorescent focus Assay of virus on Cell monolayers in plastic petri-plates
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 125, 892 (1967).

TRIPATHY, D.N., L. E. HANSON and W. L. MYERS

Detection of fowlpox virus antigen in tissue culture by fluorescent antibody technique.
Avian Dis. 14, 810 (1970).

TRIPATHY, D. N., L. E. HANSON and A. H. KILLINGER

Studies on differentation of avian pox viruses
Avian Dis. 17, 325 (1973).

TROMMER, G.

Trichomoniasis bei Habichtsnestlingen in

freier Wildbahn
Deutscher Falkenorden 69 (1964).

UPPAL,P. K. and P. R. NILAKANTAN
Studies on the serological relationship between avian pox, sheep pox, goat pox and vaccinia virus
J. Hyg. Camb. 68, 349 (1970).

WINTEROLL,G., MOUSA S. und AKRAE M.
Pockenisolate aus Psittaciden und Falken - Nähere Charakterisierung.
Deutsche Vet. G. Tagung - Krankheiten der Vögel, München 7. und 8. März 1979.

WOERNLE,H.
Erfahrung mit der Präzipitationsreaktion in festem Agarmedium bei der Diagnose von Viruskrankheiten.
Mh. Tierheilkde. 13, 111 (1961).

WOODROOFE,G. M. and FENNER F.
Serological relationship within the poxvirus group: an antigen common to all members of the group.
Virology 16, 334 (1962).

Abb. 1. CPE beim Falkenpockenvirus in sek. HFE
4 Tage p.i. (10x3,5) Giemsa-Färbung.

Abb. 2. CPE beim Psittacidenpockenvirus in sek. HFE
4 Tage p.i. (10x3,5) Giemsa-Färbung.

Abb. 3. CPE beim Hühnerpockenstamm HP-1 in sek. HFE
4 Tage p.i. (10x3,5) Giemsa-Färbung.

Abb. 4. CPE beim Taubenpockenstamm TP-1 in sek. HFE
4 Tage p.i. (10x3,5) Giemsa-Färbung.

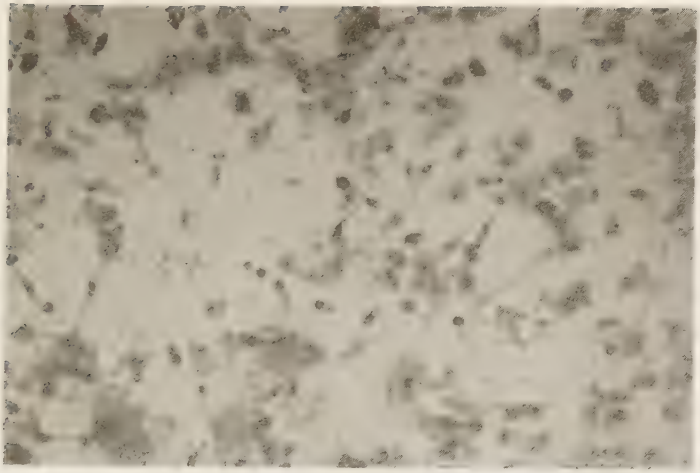

Abb. 5. CPE beim Kanarienpockenstamm KP-1 in sek. HFE 4 Tage p.i. (10x3,5) Giemsa_Färbung.

Abb. 6. CPE beim Agapornidenpockenstamm AP III/5 in sek. HFE 4 Tage p.i. (10x3,5) Giemsa_Färbung.

Abb. 7. Intraplasmatische Einschlüsse beim FP in Dermiszellen 2 T. p.i. (10x40) Giemsa_Färbung.

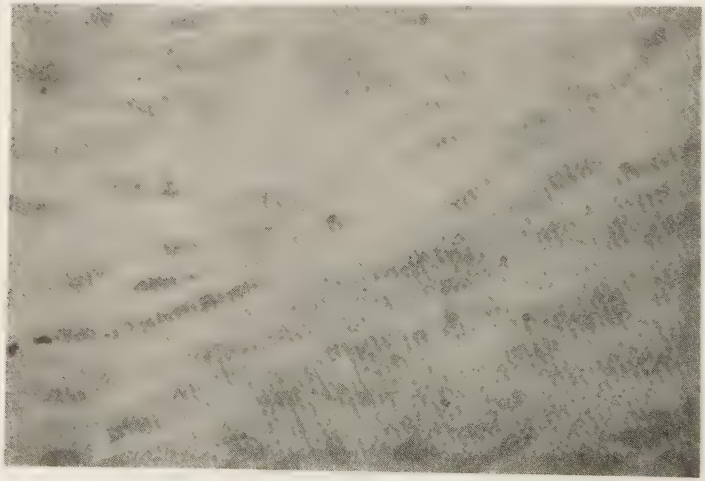

Abb. 8. Intraplasmatische Einschlüsse beim Psitt.P. in Dermiszellen 2 T.p.i. (10x25) Giemsa-Färbung.

Abb. 9. Intraplasmatische Einschlüsse beim HP in Dermiszellen 2 T.p.i. (10-40) Giemsa-Färbung.

Abb.10. Zellveränderungen durch AP in Dermiszellen 2 T.p.i. (10x25) Giemsa-Färbung.

Abb. 11. Plaque-Bildung beim FP, 8 T.p.i. Neutralrot-Färbung.

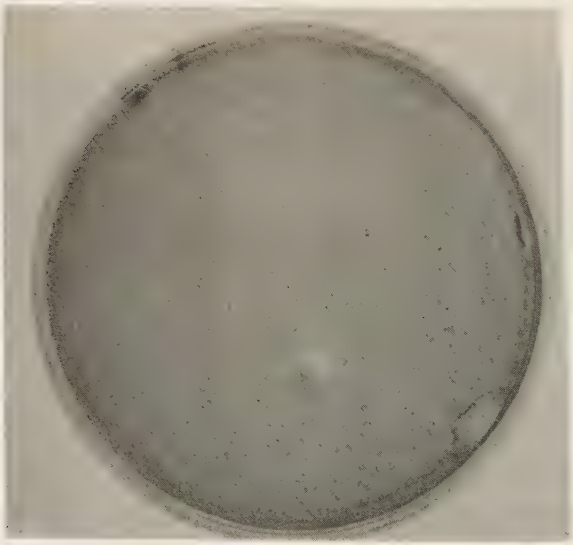

Abb. 12. Plaque-Bildung beim Psitt. P., 7 T.p.i. Neutralrot-Färbung.

Abb. 13. Plaque-Bildung beim HP, 8 T.p.i.
Neutralrot-Färbung.

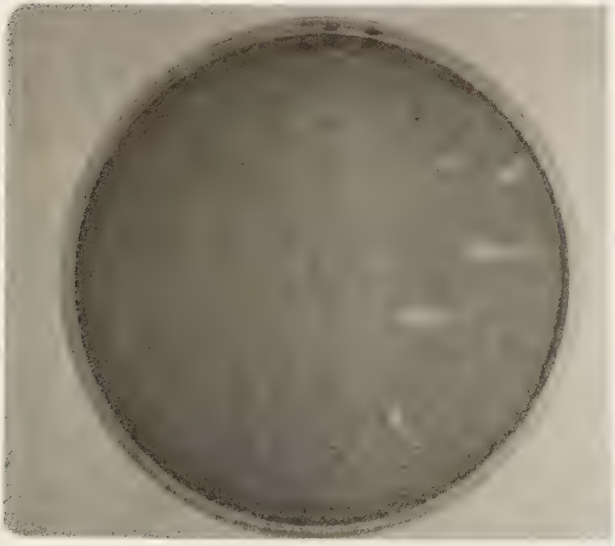

Abb. 14. Plaque-Bildung beim TP, 8 T.p.i.
Neutralrot-Färbung.

Abb. 15 Plaque-Bildung beim FF, 8 T.p.i.
Neutralrot-Färbung.

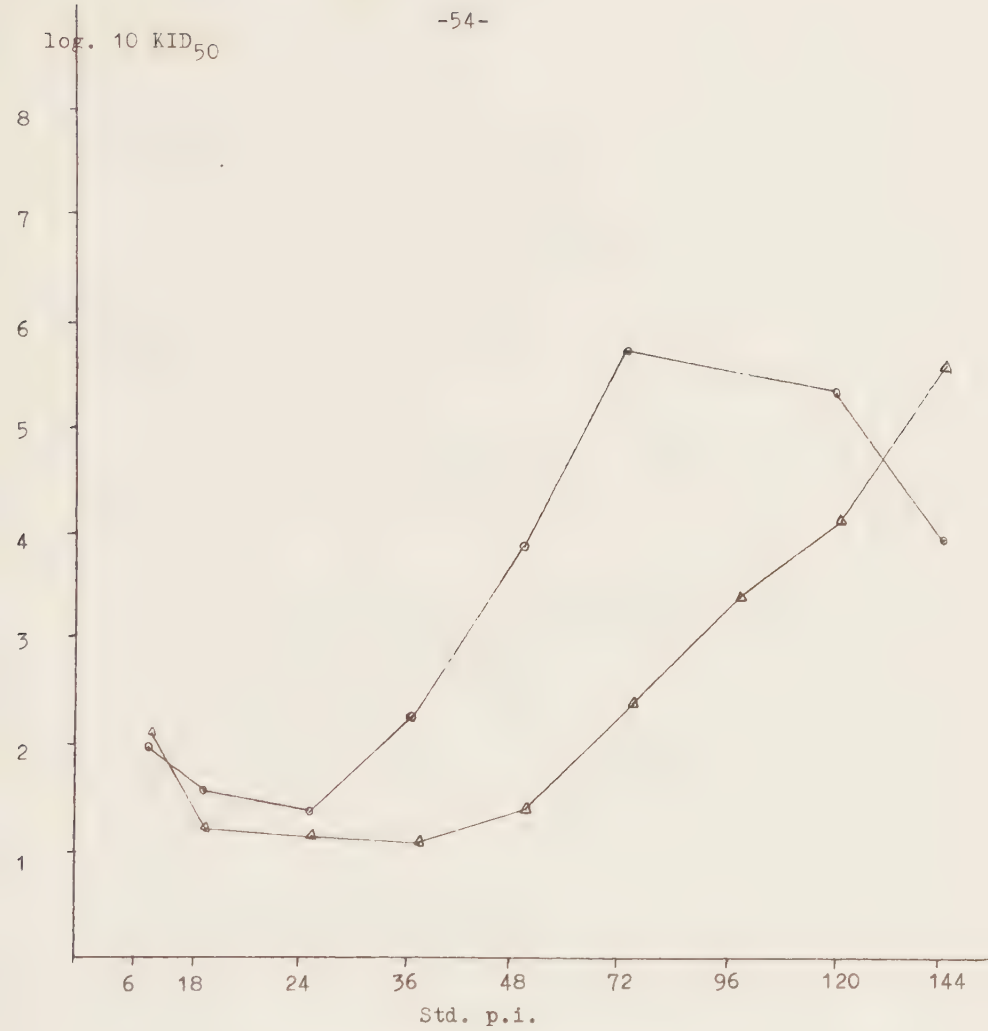

Abb. 16 : Vermehrung des Falkenpockenvirus in sek. HFE

o Zellgebundenes Virus

▵ Zellfreies Virus

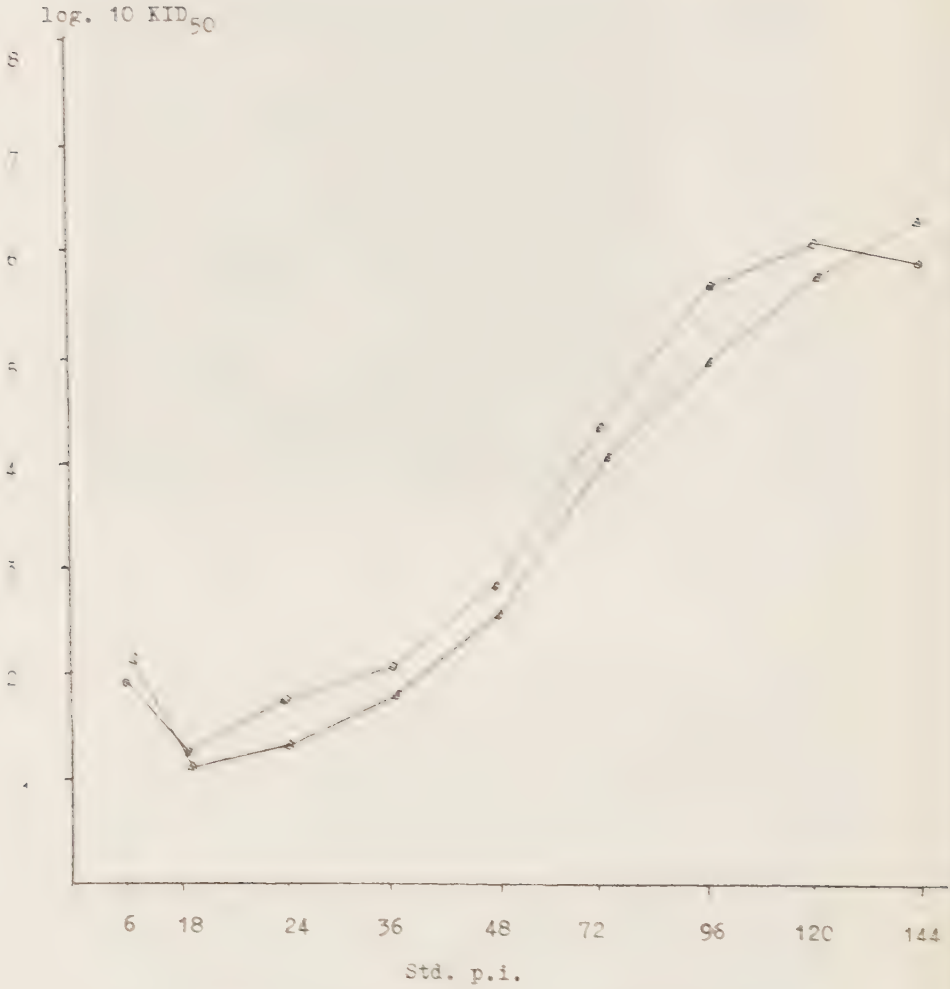

Abb. 17 : Vermehrung des Psittacidenpockenvirus in sek. HFE

o Zellgebundenes Virus

▵ Zellfreies Virus

Frau Professor Dr. I. Gylstorff möchte ich für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und für ihre großzügige Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Fräulein Dr. G. Winteroll danke ich verbindlichst für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. H. Gerlach danke ich für die Durchführung der bakteriologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Goebl am Institut für vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie danke ich für die Durchführung der elektronen-mikroskopischen Untersuchungen.

Fräulein D. Niedermann und Frau Huber möchte ich für ihre technische Assistenz meinen Dank sagen.

Für die Gewährung eines Promotionsstipendiums bin ich dem Deutschen Akademischen Austauschdienst zu großem Dank verpflichtet.

LEBENSLAUF

Am 18. August 1946 wurde ich, Salah MOUSA, in Menofia, Ägypten, als Sohn des Lehrers Abdel-Rahman MOUSA geboren.

Nach Besuch der Grundschule (Bahnay preparatory school) und des Gymnasiums (El-Bagour secondary school) in Menofia legte ich im Juni 1963 die Reifeprüfung ab.

Im Oktober des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Universität Kairo, wo ich im März 1969 das B.V.Sc.-Examen ablegte.

Im Januar 1974 absolvierte ich die Magister über "Studies on avian leukosis complex" an der Universität Assiut.

Seit April 1976 bin ich als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes in Deutschland. Ich besuchte von April bis September 1976 einen Sprachkursus am Goethe-Institut in Freiburg.

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1977 bis 1979.